Sobre a perda da acido-resistencia e a desagregação granular nos bacillos de KOCH em culturas antigas

pelo

DR. A. FONTES

Chefe de Serviço

A observação das culturas do bacillo da tuberculose em meios liquidos nos mostra que á proporção que as culturas envelhecem os corpos microbianos se depositam no fundo do vaso onde se procede a cultura.

Por observação microscopica esses corpos microbianos se apresentam alterados com aspecto mais granuloso que nas culturas em bôas condições de desenvolvimento, ao lado de numerosas granulações livres, o que deixa presumir a autolyse microbiana no meio cultural.

Este phenomeno que é constante comporta diversas interpretações:

1º)—Serão os corpos microbianos alterados á custa do phenomeno «autolyse cadaverica»?

2º)—Serão os corpos microbianos alterados á custa de fermentos elaborados in vivo pelo microbio?

3º)—Serão os corpos microbianos alterados por acto chimico não fermentativo, derivado, porém, de substancias elaboradas pelo virus?

4º)—Exercerá a composição chimica do meio acção manifesta sobre esse phenomeno de pseudo-autolyse?

5º)—A alteração morphologica dos bacillos e consequente desagregação granular estarão ligadas ás condições de vitalidade do virus?

1º)—A autolyse cadaverica é phenomeno de ordem geral que, considerado como consequente á acção fermentativa intimamente ligada ao estado physico da materia organisada, tem sido estudado na independencia de causas exteriores que por elle possam ser responsabilisadas.

A autolyse aseptica dos orgãos mostra que os fermentos que organisam a vida como os fermentos que derivam da morte reproduzem no microcosmo cellular a actividade da materia consubstanciada na energia bio-chimica.

Com os elementos bacterianos, entretanto, a observação parece demonstrar que na ausencia de causas estranhas o

phenomeno da autolyse é excessivamente lento.

A observação de culturas abandonadas em estufa ou mesmo no meio ambiente, desde que se *conservem sem contaminação*, nos mostra que os germens, ainda que alterados em sua forma, por vezes mesmo não reconheciveis morphologicamente, ainda se deixam tingir pelos corantes de anilina, indicando que, se de facto se iniciou a desagregação da materia organisada, ella não foi completa.

O que se observa de um modo geral com o cummum das bacterias mais resalta no caso particular do bacillo de KOCH.

As culturas do bacillo da tuberculose em meios solidos, ainda que mortas pela acção do tempo, deixam quando examinadas no microscopio que se verifique a integridade da grande maioria dos germens, ás vezes com fórmas involutivas, mais granulosas que nas culturas em pleno viço mas sempre reconheciveis, na unidade corpo microbiano. Ao lado dessas fórmas as granulações isoladas são muito mais numerosas que nas culturas em desenvolvimento.

Nas culturas antigas em meios liquidos a desagregação granular e a alteração dos germens é mais notavel.

Não se póde entretanto considerar esse phenomeno como uma lise perfeita do corpo microbiano por isso que as granulações são sempre reconheciveis em sua fórma, mesmo em culturas antigas de mais de 2 annos.

Observa-se a alteração da fórma dos bacillos, verifica-se a libertação das granulações mas não se constata de modo inconcusso a diluição e o desapparecimento das substancias preteinicas que constróem o corpo da granulação.

Uma longa observação me permitte concluir que «*Na independencia de causas extranhas que para esse fim intervenham as granulações do bacillo de KOCH não se diluem por autolyse cadaverica.*

2º — A pesquiza de fermentos elaborados pelas culturas da tuberculose tem resultado quasi improficuo.

BAUDRAN (1) reconheceu a existencia de uma anaeroxydase, revelavel pela agua gayacolada operando com o alcool absoluto sobre bacillos vivos.

CARRIERE (2) encontrou uma lipase analoga ou identica á lipase estudada por HENRIOT, reconhecivel por decompor a monobutyrina.

As investigações que em 1911 orientei, (FONTES (3)) usada a technica de MALFITANO (4) foram inteiramente negativas em relação á existencia de fermentos proteolyticos, zymases e oxydases.

E de facto, a experimentação feita acha-se de accordo com o que se observa nas culturas antigas. Se o envelhecimento das culturas torna mais abundantes as granulações isoladas, corrobora essa observação a idéa de ausencia de fermentos capazes de as digerir. Tambem não se pode admittir que a desagregação das granulações e a alteração dos bacillos se dê nas culturas em virtude da acção da lipase encontrada por CARIÉRE.

Sendo a producção da lipase um acto vital do germen deveria esse fermento exercer sua acção *in vivo* e, por consequencia os germens não conservariam a sua integridade morphologica nas lesões.

Ora, sabemos que ahi só a acção da lipase cellular especifica é capaz de alterar a morphologia do bacillo (FONTES) (5) FIESSINGER e MARIE (6).

Um outro argumento deriva do seguinte facto. No periodo mais pujante do desenvolvimento da cultura, o acmé da vitalidade é representado pela maior riqueza, nos caldos das culturas, dos productos elaborados pelo germen e entretanto nesse periodo os corpos bacillares se apresentam bem constituidos, sendo relativamente escasso o numero de granulações desagregadas.

«O contrario deveria succeder se essa desagregação dependesse de um fermento, elaborado pelo corpo microbiano»

3º — A terceira hypothese até certo ponto elucida os phenomenos em questão.

A composição chimica do bacillo da tuberculose nos demonstra ser esse organismo rico em alcoos superiores, acidos graxos não saturados e phosphatides diversos.

In vitro ' pode-se demonstrar a acção clivante e mesmo litica de algumas dessas substancias.

A cholesterina, a lecithina e as bases quaternarias ammoniacaes são substancias que quando, em condições particulares, postas em contacto com culturas de tuberculose, manifestam sua acção dissolvente, sobre os corpos microbianos.

A observação de DEYCKE e MUCH (7) nesse sentido tem sido corroborada por investigações posteriores unanimes. Assim nas culturas da tuberculose a libertação desses principios que, ainda que lentamente, se diffundem no meio liquido, permitte a dissolução dos lipoides microbianos e consequente libertação das granulações. E, de facto, é propriedade geral dos lipoides se dissolverem mutuamente (IVAR BANG (8)).

Os phosphatides e as gorduras teem essa propriedade accentuada e os acidos graxos não saturados, assim como, seus sabões soluveis são fortemente activos.

Ainda que a tendencia actual seja para approximar essas reacções bio-chimicas das reacções por fermentos solu veis, devemos antes consideral-as como reacções de saponificação ou hydrolyse chimica não fermentativa, por isso que são acceleradas com a elevação de temperatura incompativel com a acção dos fermentos.

E' o que se conclue da acção da bile de boi e de lipoides diversos do oleo de figado de bacalhau que exercem acção desagregante e algum tanto litica sobre os bacillo de KOCH em temperatura proximas á de 100º C.

Assim pois, a *«constituição chimica do bacillo de KOCH, sua riqueza em alcoos superiores, gorduras e phosphatides e a diffusão desses lipoides nos meios de cultura explicam a alteração morphologica dos bacillos e a libertação das granulações na independencia de acção fermentativa»*.

4º—As culturas de tuberculose se desenvolvem em meios nutritivos das mais diversas origens e variada composição chimica.

Meios de origem animal, meios vegetaes ou mesmo chimicamente definidos, permittem o desenvolvimento de culturas em que os bacillos guardam as suas principaes caracteristicas: a acido-resistencia e a estructura granular.

Não quer isso dizer que se não possa obter modificação da fórma e da estructura do bacillo desde que a composição chimica do meio nutritivo possa alterar as modificações biologicas do germem, como succede com os meios fortemente glycerinados ou com aquelles em que se addicionam lipoides de varias origens. Mas, nesses casos, as culturas que se desenvolvem, profundamente alteradas em suas condições biologicas, não podem ser considaradas como culturas normaes. Mesmo assim, em algumas dellas, como succede com as culturas homogeneas, desde que cesse de agir a causa perturbadora do desenvolvimento normal da cultura, volta esta ao typo originario, permittindo que sejam observadas as formas microbianas com as suas caracteristicas peculiares.

Nas culturas homogeneas o abandono da cultura e a parada da agitação diaria permitte a formação de pelle constituida por bacillos que readquirem a sua acido resistencia e estructura granular.

A variabilidade da reacção chimica do meio cultural que segundo decorre da observação de TH. SMITH (9) em culturas do typo bovino é correlata ao

prazo de desenvolvimento da cultura, não exerce acção apreciavel sobre os phenomenos em questão, pois que as culturas de seis semanas, achando-se em plena maturidade, tendo soffrido duas vezes a inversão da reacção chimica do meio apresentam as fórmas microbianas em perfeito estado de integridade estructural.

Assim «*quando a cultura de tuberculose é collocada em condições normaes de desenvolvimento, nem a composição chimica do meio nem a alteração da reacção parecem ter influencia manifesta na producção da alteração morphologica do bacillo e na desagregação das granulações.*

5º—Do estudo das culturas de tuberculose em meios artificiaes é muito difficil se poder concluir que a alteração morphologica dos bacillos e a desagregação granular dependem exclusivamente das condições proprias a vitalidade do virus.

De facto nas proprias culturas homogeneas, em que assistimoos ás profundas modificações da forma e da virulencia do bacillo de KOCH o desenvolvimento da cultura é facilitado pelas tansplantações successivas. Entretanto, em condições normaes de desenvolvimento em meios artificiaes, o envelhecimento das culturas determina o aparecimento de maior numero de formas alteradas que o existente nas culturas em pleno viço.

'E' o que é notavel, seja qual fôr o prazo de envelhecimento desde que a cultura permaneça viva, ainda que se possa constatar um certo gráo de attenuação do virus, não perde elle o seu poder infectante.

Da observação da infecção tuberculosa resalta, entretanto, que a variabilidade morphologica do virus obedece até certo ponto, a resistencia que o organismo oppõe ao seu desenvolvimento.

Na infecção tuberculosa pulmonar chronica a forma granular é observada com maior frequencia que nos casos de evolução aguda ou sub-aguda, e essa verificação é mais facil nos cavitarios antigos.

A constatação da forma granular no pus de origem tuberculosa, a presença dessa forma nos casos de lupus, a variedade das formas acido-resistentes nessas lesões são factos accordes em indicar certa relação de causa e effeito, permittindo presumir ser a forma granular a forma de resistencia do virus, que o representa na sua forma residual infectante.

A acido-resistencia é caracter adquirido com o cyclo de desenvolvimento vital do germen. Nas culturas recentes como nas antigas falha tal caracteristica sem que por tanto deixem ellas de ser infectantes.

As granulações existem sempre nessas culturas. Se acaso nas culturas recentes as granulações apresentam uma estructura menos condensada, parece acharse isso ligado a reproducção do bacillo com a producção de granulos menores que derivam dos outros.

O estudo da cytologia do bacillo mostra que a funcção que a granulação exerce na reproducção bacillar é essencial (FONTES) (1)). Ora sendo a granulação o ponto de origem da organisação do corpo bacillar, sendo ella eliminada do corpo microbiano constituindo novos centros de desenvolvimento cultural, não sendo ella destruida pelas causas communs de destruição inherentes aos meios de cultura taes como exgottamento do meio, acção de fermentos eloborados pela cultura, alteração das condições physico-chimicas do meio nutritivo, é logico admittir que «*o augmento e libertação das granulações do bacillo da tuberculose, nas culturas antigas, representa o esforço de resistencia que o virus oppõe ás causas perturbadoras de sua vitalidade*».

BIBLIOGRAPHIA

1º)—BANDRAN, M. G. —Compt. rend. acad. d. sci. T. 142. pag. 657—659—*1906*.

2º)—CARRIERE —Compt. rend. soc. biol. 1901—nº 11

3º)—FONTES, A. —Mem. do Inst. Osw. Cruz—T. III. Fasc. II. pags. 195—219—1911.

4º)—MALFITANO G. —Annaes de l'Inst. Pasteur. T. XLV. 2e. Memoire—1900.

5º)—FONTES A. —op. c. pg. 207.

6º)—FIESSENGER N. —N.-et Marie-Pierre Louis-Les ferments digestifs des leucocytes—1910.

7º)—DEYCKE und MUCH —Munch. Med. Woch. 1910. Berld. Klin. Woch. 1910-nº 421.

8º)—BANG, IVAR —Chemie und Biochemie der lipoide—1911.

9º)—TH. SMITH —Journ. med. research.-Vol. 13 nº 3. 1905.

10º)—FONTES, A. —Mem. do Inst. Osw. Cruz. T. II. Fasc. II. pags. 186—206—1910.